

Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Escola de Ciências Médicas e da Vida

Medicina



Modelagem molecular das interações intermoleculares entre a neuraminidase do vírus influenza e a epigallocatequina

Anna Maria Andrade Barbosa

Christyan Polizeli de Souza

Goiânia – GO

2022

Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Escola de Ciências Médicas e da Vida

Medicina



Modelagem molecular das interações intermoleculares entre a neuraminidase do vírus influenza e a epigalocatequina

Anna Maria Andrade Barbosa

Christyan Polizeli de Souza

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUCGO, como requisito para obtenção do título de bacharel em medicina.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Barreto da Silva

Goiânia – GO

2022

Resumo

Pelargonium sidoides D.C. (Geraniaceae) é uma espécie nativa da África do Sul, que tem como um dos componentes do seu extrato a epigalocatequina. Tal molécula apresenta alto potencial terapêutico contra infecções virais, pois possui a capacidade de suprimir a atividade da neuraminidase, o que reduz a permeabilidade da membrana do vírus influenza. Assim, a espécie vegetal possui potencial antiviral para o combate de infecções do trato respiratório causadas pelo vírus influenza a partir da bioatividade da epigalocatequina. Deste modo, busca-se compreender a relação estrutura-atividade da epigalocatequina na inibição da neuraminidase do vírus da Influenza. A metodologia empregada utilizou a abordagem farmacofórica, na qual as propriedades estereoelétricas da epigalocatequina foram comparadas com as observadas nos fármacos inibidores da neuraminidase disponíveis comercialmente. Foram empregadas também estratégias de predição das propriedades farmacocinéticas do princípio ativo vegetal. Os resultados evidenciam que a epigalocatequina apresenta características moleculares compatíveis com os observadas nos fármacos inibidores da neuraminidase do vírus influenza, o que a credencia como um importante ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais inspirados em produtos de origem natural.

Palavras-chave: *Pelargonium sidoides*, antiviral, plantas medicinais, modelagem molecular, farmacóforo.

Introdução

Pelargonium sidoides D.C. (Geraniaceae), espécie nativa da África do Sul, conhecida popularmente como “*umckaloabo*”, nome derivado das palavras *umkhulkane* e *uhlabo* que em Zulu significam queixas relacionadas com doenças pulmonares e dor no peito (1). Na fitoterapia é utilizada principalmente por meio de extrato padronizado produzido a partir das raízes da planta. O extrato é utilizado não apenas em sua região nativa, mas em países europeus

(comercializado na Alemanha para tratamento de bronquite aguda), nos países Bálticos, no México e no Brasil (2).

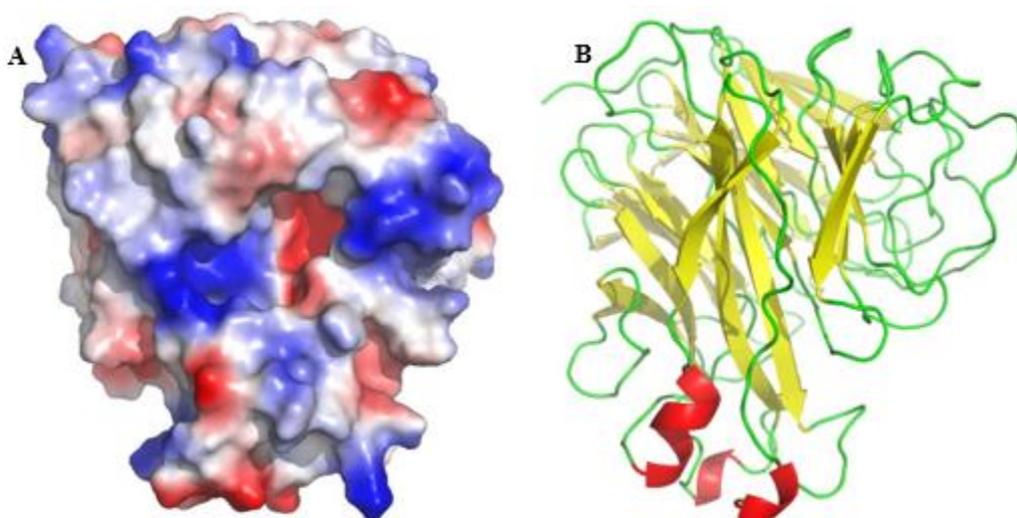
Os principais constituintes podem ser divididos entre os encontrados nas raízes da espécie (cumarinas, ácido gálico e proantocianidinas) e nas partes aéreas (flavonoides, taninos hidrolisáveis, ácido fenólicos e cumarinas). Entre os compostos identificados, podemos destacar, umckalina, escopoletina, orientina, isoorientina e epigalocatequina-3-O-galato (1;3), sendo esse último objeto de destaque neste trabalho, devido ao seu potencial terapêutico derivado da capacidade das catequinas suprimirem a atividade da hemaglutinina e reduzir a permeabilidade da membrana viral nas infecções (4).

As infecções virais são de importância clínica, tendo notoriedade na atenção à saúde os vírus da influenza dos tipos A, B e C (IAV, IBV e ICV) que infectam humanos a partir do epitélio respiratório e possuem altas taxas de mutação que permitem a evasão da imunidade. É importante ressaltar que os tipos A e B são responsáveis pelas principais doenças em indivíduos com influenza. Os dois subtipos de vírus influenza A, H1N1 e H3N2, são conhecidos por causar pandemias de gripe. Ambos mudam geneticamente e antigenicamente para produzir variantes. O H3N2 tende a mudar rapidamente, tanto geneticamente quanto antigenicamente, enquanto o H1N1 geralmente tende a ter mudanças menores. Os vírus da gripe A (H3N2) evoluíram para formar muitos clados separados e geneticamente diferentes que continuam a co-circular. Vale ressaltar o aumento significativo dos casos de influenza pelo vírus H3N2 nos últimos anos com elevação do número de mortes, conforme relatório da Organização Mundial da Saúde (5; 6).

A atividade da proteína neuraminidase (NA), um tetrâmero de quatro polipeptídeos (Figura 01) presente no vírus, é essencial para a sua replicação, desempenhando um papel vital em vários pontos diferentes do seu ciclo de vida. Um ponto de destaque é que ela facilita o acesso às células epiteliais do trato respiratório, permitindo a posterior liberação de vírions de receptores chamarrizes presentes nas mucinas. Além disso, a NA é essencial para a liberação de partículas de vírus nascentes, com atividade enzimática inadequada, resultando

em tamanho reduzido da placa devido à propagação célula a célula ineficiente. Essa atividade também evita a agregação de vírions, removendo os ácidos siálicos de suas próprias glicoproteínas. Isso pode explicar a associação entre a atividade de NA e transmissibilidade, uma vez que os vírions não agregados são mais propensos a serem transmitidos em pequenas gotículas de aerossol que são inaladas para o trato respiratório inferior (7; 8).

Figura 01- Estrutura 3D do monômero da neuraminidase do vírus influenza.



A- Superfície de potencial eletrostático do monômero de neuraminidase.
B- Estrutura terciária do monômero de neuraminidase

Existem relatos na literatura do efeito positivo *in vitro* das catequinas presentes no extrato de *Pelargonium sidoides* contra a influenza. O mecanismo proposto envolve a supressão da atividade de hemaglutinina, impactando negativamente a formação do complexo viral de RNA polimerase, bem como a internalização das partículas de vírus, reduzindo a permeabilidade da membrana viral e afetando a neuraminidase presente nas diferentes cepas da influenza vírus A. Ensaio *in vivo* em modelo de camundongos sugerem efeitos protetores dos ingredientes ativos vegetais se administrados por inalação contra um desafio de vírus letal em concentrações não tóxicas (4;9).

Dessa forma, a espécie *Pelargonium sidoides* possui propriedades antivirais para o combate de infecções do trato respiratório causadas pela influenza, em que a epigalocatequina parece ser uma das moléculas mais

relevantes. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo descrever a relação estrutura-atividade e os mecanismos moleculares de interação da epigallocatequina, presente no extrato do *Pelargonium sidoides*, com a neuraminidase do vírus Influenza através do emprego de técnicas de modelagem molecular baseadas no conceito de farmacóforo.

Metodologia

O desenho da pesquisa se caracteriza pelo emprego de técnicas de modelagem molecular para determinação do potencial da epigallocatequina como inibidor da neuraminidase do vírus influenza. A abordagem utilizada foi a modelagem farmacofórica, na qual as propriedades estereoelétricas da epigallocatequina foram comparadas com as observadas nos inibidores da neuraminidase já descritos na literatura (10) e disponíveis comercialmente. Além disso, foram realizadas predições das propriedades farmacocinéticas da epigallocatequina. Para que as estratégias metodológicas fossem empregadas, foi necessário inicialmente modelar as estruturas 2D e 3D de cada uma das moléculas. Dessa forma, cada etapa metodológica foi realizada de acordo com a descrição abaixo.

MODELAGEM DA EPIGALOCATEQUINA: A estrutura química da epigallocatequina e dos inibidores da neuraminidase foi modelada em representações 2D e 3D por meio do programa computacional ACD/ChemSketch Freeware Version (Advanced Chemistry Development, Inc.). Arquivos moleculares nos formatos mol foram inicialmente gerados e, posteriormente, os arquivos mol2 foram gerados a partir do programa Discovery Studio 3.5 da Biovia para cada molécula.

DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES ADME (ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO E ELIMINAÇÃO) DA EPIGALOCATEQUINA: as propriedades ADME da epigallocatequina foram estimadas através do servidor SwissADME (11), no sentido de caracterizar o perfil farmacocinético da molécula.

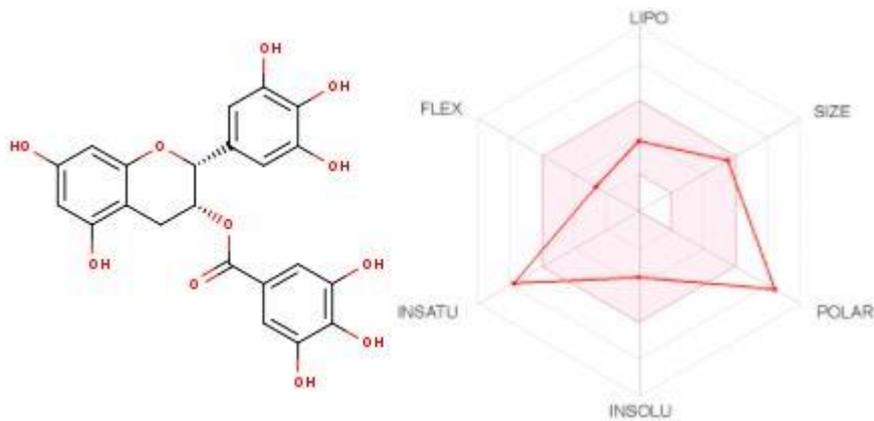
DETERMINAÇÃO DA SIMILARIDADE FARMACOFÓRICA: as características estereoelétricas dos fármacos inibidores da neuraminidase (Zanamivir, Oseltamivir, Laninamivir e Peramivir) foram comparadas com as da epigalocatequina. Para tal, foi utilizada a abordagem da modelagem por farmacóforo, através do uso do programa Pharmagist (12). O termo farmacóforo é definido como o arranjo espacial de características químicas que permite um grupo de moléculas interagir com um alvo biológico através de um modo de ligação específico (12; 13;14), de modo que o grau de semelhança do arranjo espacial de características químicas observado entre epigalocatequina e os inibidores da neuraminidase foi utilizado como critério para avaliação do potencial inibitório sobre a neuraminidase do produto natural. Para criação dos modelos foi definido um número de farmacóforos de saída igual a 5, associado a um número mínimo de características farmacofóricas igual a 3. Nenhuma das moléculas do arquivo foi estabelecida como molécula-chave. Os pesos das características farmacofóricas foram atribuídos segundo a configuração padrão do programa, ou seja, aromático igual a 3, carga igual a 1, acceptor e / ou doador de ligação de hidrogênio igual a 1,5 e hidrofóbico igual a 0,3. O modelo de maior pontuação contendo a epigalocatequina foi selecionado para definição da relação estrutura-atividade para inibição da neuraminidase.

Resultados e Discussão

Propriedades físico-químicas e biodisponibilidade da epigalocatequina-3-galato

As propriedades físico-químicas da epigalocatequina foram estimadas com o auxílio do programa SwissADME. Foram obtidas as propriedades do composto e gerado o radar de biodisponibilidade para a epigalocatequina (figura 02), sendo dos 6 parâmetros observados 4 ficaram dentro da média ideal: lipofilicidade, flexibilidade, peso molecular e solubilidade. Quanto maior é o número de parâmetros dentro da faixa ideal, maior é a probabilidade da molécula ser bioativa por via oral.

Figura 02 – Radar de biodisponibilidade da epigalocatequina gerado a partir de suas propriedades físico-químicas.



Em relação à biodisponibilidade, de forma mais específica, no que se diz respeito à “semelhança com fármacos”, em que se avalia qualitativamente a chance de uma molécula se tornar um medicamento bioativo por via oral (biodisponibilidade) por meio dos métodos Ghose (Amgen), Veber (GSK), Egan (Pharmacia), Lipinski e Muegge (Bayer), apenas nos critérios de Ghose avaliou-se a epigalocatequina como uma molécula de potencial favorável para fármacos orais. Nos demais ocorreram violações de TPSA (Veber, Egan e Muegge), NorO e NHorOH na regra de Lipinski e H-acc e H-don em Muegge.

De forma geral, as predições farmacocinéticas para a epigalocatequina sugerem absorção gastrointestinal humana passiva, entretanto sem permeabilidade hematoencefálica ou inibição de citocromos, sendo assim a epigalocatequina possui valores preditivos positivos para uma boa absorção e baixa propensão para interações medicamentosas significativas, o que é desejável para fármacos. Por fim, foi obtido o grau de acessibilidade sintética do produto natural, o qual foi pontuado em 4.20 na escalada de 1 (fácil) a 10 (extremamente difícil).

Determinação da Similaridade Farmacofórica

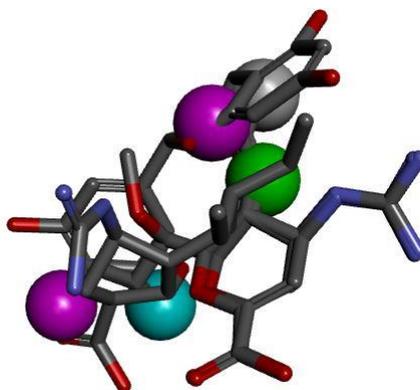
Na busca por determinar o potencial inibitório da neuraminidase pela epigalocatequina, utilizou-se a determinação de similaridade farmacofórica com fármacos utilizados na prática médica capazes de realizar tal inibição, incluindo, Zanamivir, Oseltamivir, Laninamivir e Peramivir. Apesar de serem fármacos sintéticos, é notável a semelhança com a epigalocatequina, o que fica mais evidente após a obtenção dos modelos farmacofóricos (Figura 2).

Na Figura 2a é representado um modelo em que está presente o Zanamivir, Laninamivir, Peramivir e a epigalocatequina. Nessa imagem foram encontrados 5 pontos de ancoragem, ou seja, representam características comuns entre inibidores da neuraminidase e a epigalocatequina. As características do modelo refletem: 1 hidrofóbico, 1 aceptor e doador, 1 doador e 2 aceptores de ligação de hidrogênio.

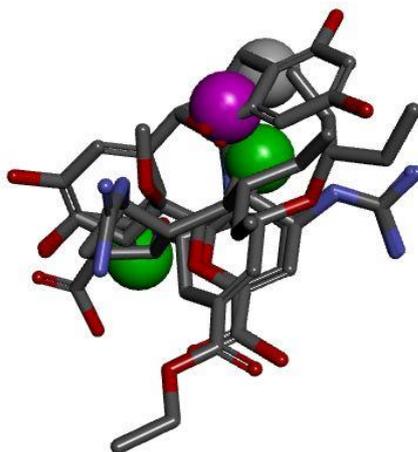
Nas figuras 2b e 2c são representados modelos com os pontos de ancoragem entre epigalocatequina e inibidores (Zanamivir, Laninamivir, Peramivir e Oseltamivir). Percebe-se que comparados com o modelo da figura 1, o número de pontos de ancoragem diminuem de 5 para 4.

Figura 02 – Modelos de Similaridade Farmacofórica

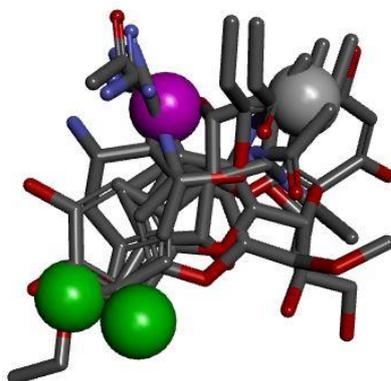
(2a) - Zanamivir, Laninamivir, Peramivir e epigalocatequina



(2b) - Epigalocatequina com Zanamivir, Laninamivir, Peramivir e Oseltamivir



(2c) - Epigallocatequina com Zanamivir, Laninamivir, Peramivir e Oseltamivir



Legenda: Cinza para características hidrofóbicas, azul para aceptores e doadores de ligação de H, verde para doadores de ligação de H e roxo para aceptores de ligação de hidrogênio.

Conclusão

Com a realização da pesquisa foi observado que a epigallocatequina possui potencial para ser uma molécula bioativa por via oral sem permeabilidade hematoencefálica e inibição de citocromos. Além disso, observou-se alta bisemelhança de características químicas com os fármacos inibidores da neuraminidase, o que credencia a epigallocatequina a ser um interessante ponto de partida para inspirar o desenvolvimento de novos fármacos antivirais otimizados.

Referências

1. MAZZUCO, Bruna *et al.* PELARGONIUM SIDOIDES DC. (UMCKALOABO): histórico do uso, aspectos taxonômicos, ecológicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos. **Tecnologia e Ambiente**, [S.L.], v. 20, p. 282-300, 17 dez. 2014. Fundacao Educacional de Criciuma- FUCRI. <http://dx.doi.org/10.18616/ta.v20i0.1763>.
2. KOLODZIEJ, Herbert. Antimicrobial, Antiviral and Immunomodulatory Activity Studies of Pelargonium sidoides (EPs® 7630) in the Context of Health Promotion. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 4, n. 10, p. 1295-1314, 10 out. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph4101295>.
3. KOLODZIEJ, Herbert. Fascinating metabolic pools of Pelargonium sidoides and Pelargonium reniforme, traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine Umckaloabo®. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 14, p. 9-17, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2006.11.021>.
4. MÜLLER, Patrick; DOWNARD, Kevin M. Catechin inhibition of influenza neuraminidase and its molecular basis with mass spectrometry. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 111, p. 222-230, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.03.014>.
5. HUTCHINSON, Edward C. Influenza Virus. **Trends In Microbiology**, v. 26, n. 9, p. 809-810, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.013>.
6. RAVINA *et al.* A changing trend in diagnostic methods of Influenza A (H3N2) virus in human: a review. **3 Biotech**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02642-w>
7. AIR, Gillian M. Influenza neuraminidase. **Influenza And Other Respiratory Viruses**, v. 6, n. 4, p. 245-256, 16 nov. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00304.x>.
8. EICHELBERGER, Maryna C.; WAN, Hongquan. Influenza Neuraminidase as a Vaccine Antigen. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, p. 275-299, 2014. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/82_2014_398.

9. THEISEN, Linda L. *et al.* EPs® 7630 (Umckaloabo®), an extract from *Pelargonium sidoides* roots, exerts anti-influenza virus activity in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 94, n. 2, p. 147-156, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.03.006>.
10. GILSON, Michael K. *et al.* BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. *Nucleic Acids Research*, [S. I.], v. 44, n. D1, p. D1045–D1053, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1072>. Acesso em: 30/04/2021
11. DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, 3 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep42717>.
12. SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J.. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 36, n. , p. 223-228, 19 maio 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn187>.
13. WOLBER, G.; SEIDEL, T.; BENDIX, F.; LANGER, T. Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 23-29, 2008.
14. YANG, S. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 444-450, 2010.